



بررسی خواص برون تنی و ضدباکتریایی شیشه‌های زیست فعال حاوی مس و منیزیم

امیرحسین مغانیان^{*}، محمدامین ظهور فاضلی

گروه مهندسی مواد، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، قزوین، ایران

چکیده این پژوهش، با هدف بررسی تأثیر حضور مس و منیزیم بر خواص ساختاری، زیستی و عملکرد ضد-باکتریایی شیشه‌های زیست فعال 58S انجام شده است. ارزیابی ساختاری و ریزساختاری سطح شیشه‌های سنتز شده به روش سل-ژل، با استفاده از آزمون‌های پراش اشعه X (XRD)، طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) صورت گرفت. تأثیر ترکیب مس و منیزیم بر کیفیت و کمیت زیست فعالی برون تنی، به کمک آزمون‌های زولیم برماید (MTT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) مورد بررسی قرار گرفت. عملکرد ضدباکتریایی شیشه‌های زیست فعال حاوی مس و منیزیم در برابر باکتری MRSA، بررسی شد. نتایج، تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت را روی سطح شیشه‌ی زیست فعال تأیید کرد. افزودن مس و منیزیم به ترکیب شیشه زیست فعال 58S، موجب افزایش فعالیت و تکثیر سلولی و بهبود عملکرد ضدباکتریایی شد. نتایج حاکی از مقدار بهینه منیزیم و مس در ترکیب شیشه زیست فعال BG-5/5 (حاوی ۵ درصد مولی از هر کدام از MgO و CuO) است.

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۳۹۸/۰۵/۰۳
دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۹/۰۴/۱۰
پذیرش قطعی: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹

کلیدواژه‌ها:

آپاتیت،
زیست فعالی،
کاربردهای زیست پزشکی،
فرآیند سل-ژل

<https://doi.org/10.30501/jamt.2020.195763.1041>

URL: http://www.jamt.ir/article_117580.html

JAMT: Vol. 9, No. 2, (Summer 2020), 19-33

Investigation the In Vitro and Bactericidal Properties of Magnesium and Copper Containing Bioactive Glasses

Amir Hossein Moghanian^{*}, Mohammad Amin Zohour Fazeli

Department of Materials Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Qazvin, Iran

Paper History:

Received: 2019-07-25
Revised in revised form: 2020-06-30
Accepted: 2020-10-10

Keywords:

Apatites,
Bioactivity,
Biomedical Applications,
Sol-Gel Process

Abstract The study aimed to investigate the performance and evaluate the effect of incorporation of Cu and Mg on the structural, biological, and bactericidal properties of the sol-gel derived 58S bioactive glass containing Mg and Cu. The structural and morphological evaluations of the synthesized glasses were performed by the mean of X-ray diffraction (XRD), Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM) analysis. The effect of Cu and Mg content in the composition on the quality and quantity of in vitro bioactivity was examined by performing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and alkaline phosphate (ALP) analysis. The antibacterial performance of Cu and Mg incorporated bioactive glasses were evaluated against MRSA bacteria. The results confirmed the formation of a hydroxyapatite layer on the glass surface. Adding copper and magnesium to the 58S bioactive glass composition increased cell activity and proliferation and improved antibacterial performance. The results suggest that BG-5/5 (including 5 mol % of both CuO and MgO) as the bioactive glass with the optimal amount of magnesium and copper in its composition.

<https://doi.org/10.30501/jamt.2020.195763.1041>

URL: http://www.jamt.ir/article_117580.html

*عهده دار مکاتبات

نشانی: ایران، قزوین، قزوین، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی مواد، تلفن: ۰۹۱۲۳۸۱۶۱۰۳، دورنگار: -

پیام نگار: moghanian@eng.ikiu.ac.ir

Please cite this article as: Moghanian, A. H., Zohour Fazeli, M. A., "Investigation the in vitro and bactericidal properties of magnesium and copper containing bioactive glasses", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 9, No. 2, (2020), 19-33. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2020.195763.1041>).



۱- مقدمه

هدف مهندسی بافت استخوان، ترمیم و تعویض بافت‌های اسکلتی آسیب‌دیده در زخم‌ها، پوکی استخوان و مشکلات مخرب مرتبط با افزایش سن است [۱، ۲]. این فناوری، مواد زیستی مناسب بسیاری را برای ترمیم و تعویض استخوان‌ها معرفی کرده است [۳، ۴]. در این میان، زیرمجموعه‌ی کامپوزیت‌های آمورف سیلیکاتی، تحت‌عنوان شیشه‌های زیست‌فعال، نقش بسیار مهمی را در ایجاد زمینه‌ی مناسب برای ترمیم استخوان ایفا می‌کنند [۵، ۶]. شیشه‌های زیست‌فعال، به‌طور معمول، به روش سل-ژل سنتز می‌شوند که شیوه‌ای قابل‌اعتماد، به‌جای روش قدیمی ذوبی است [۷]. انجام فرآیند سل-ژل در دمای اتاق، مانع تبخیر پیش‌ماده‌های فعال همانند P_2O_5 می‌شود و منجر به خلوص بالاتر و همگنی بیشتر محصولات می‌گردد [۸، ۹]. همچنین، روش سل-ژل، موجب سهولت تشکیل ترکیب فشرده‌ای از یون‌های آلی مختلف در ساختار شیشه‌های زیست‌فعال می‌شود.

ترکیب عناصر افزودنی مختلف، همچون قلبایی [۱۰]، قلبایی-ساکسی [۱۱، ۱۲]، واسطه [۱۳، ۱۴] و پس‌واسطه [۱۵، ۱۶]، عملکرد شیشه‌های زیست‌فعال را افزایش می‌دهد و استخوان‌زایی [۱۶، ۱۷]، رگ‌زایی [۱۴، ۱۸] و ویژگی‌های ضد-باکتریایی [۱۴، ۱۹] را پدید می‌آورد. منیزیم، چهارمین کاتیون فلزی فراوان در بدن انسان و دومین کاتیون متداول درون سلولی است [۲۰] که از این میزان، حداکثر حدود ۵۰ تا ۶۰ درصد منیزیم، درون اسکلت، ذخیره می‌شود [۲۱]. کمبود منیزیم، می‌تواند به‌عنوان عاملی خطرناک برای پوکی استخوان شناخته شود [۲۲]. نتایج مطالعه موردی نشان داد که رژیم‌های فاقد منیزیم، موجب جلوگیری از رشد استخوان می‌شوند [۲۵-۲۳]؛ بنابراین، منیزیم، نقش مهمی در تشکیل استخوان، افزایش فعالیت سلول‌های استخوان‌ساز و جلوگیری از فعالیت سلول‌های استخوان‌کاه دارد.

از سوی دیگر، مس، فلزی کمیاب و ضروری برای راه‌اندازی برخی از فرآیندهای زیستی است. مس، به سبب افزایش فرآیند رگ‌زایی ابتدایی و تحریک تکثیر سلول اندوفلایل^۱ انسان، به‌عنوان عامل رگ‌زایی مؤثری شناخته می‌شود [۲۶]،

[۲۷]. گزارش‌های پیشین نشان می‌دهد که افزودن ۵ درصد مولی CuO به ترکیب شیشه زیست‌فعال، می‌تواند بر بازده ضد باکتریایی [۱۴] و نیز توانایی ترمیم استخوان بهبودیافته و تحریک رگ‌زایی بیشتر آن در مقایسه با شیشه زیست‌فعال بدون مس، تأثیر قابل‌توجهی داشته باشد. در این راستا، وو^۲ و همکاران [۱۴]، فعالیت مهم ALP و تحریک عامل رشد اندوتلیال عروقی^۳ (VEGF) در سلول‌های استرومال مغز استخوان انسان (hBMSCs) را در شیشه‌های زیست‌فعال حاوی ۵ درصد مولی CuO گزارش کردند. همچنین، لی^۴ و همکاران [۲۸]، بیان کردند که نانوکامپوزیت‌های شیشه زیست‌فعال حاوی پوشش مس (۵ درصد مولی CuO موجود در غشای طبیعی تخم‌مرغ)، سبب بهبود عامل رشد اندوتلیال عروقی در هنگام فرآیند ترمیم زخم از طریق تحریک رگ‌زایی می‌شود. یه^۵ و همکاران [۲۹]، گزارش دادند که شیشه‌ی زیست‌فعال متخلخل حاصل از جایگزینی CuO در ترکیب $SiO_2-CaO-SrO-P_2O_5$ با ۵ درصد مولی Cu ، برای پوشش‌دهی مناسب است. در پژوهش دوم، به ساختار متخلخل هیدروکسی-آپاتیت^۶ اصلاح شده با فعالیت قوی ضد-باکتریایی در برابر باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus*، دست پیدا کردند. براین اساس، در این پژوهش، مقدار معینی از CuO (۵ درصد مولی)، به‌عنوان حداکثر میزان مس در سنتز شیشه‌های زیست‌فعال حاوی مس و منیزیم، در نظر گرفته شده است. باوجود پژوهش‌های قابل توجه در زمینه‌ی شیشه‌های زیست‌فعال حاوی منیزیم، تا به امروز، تأثیر مقدار منیزیم بر تشکیل لایه هیدروکسی-آپاتیت و زیست‌فعالی برون‌تنی^۷ آن، به‌طور دقیق، بررسی نشده است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که در حضور یون‌های منیزیم، تأخیر در شکل‌گیری هیدروکسی-آپاتیت رخ می‌دهد. همچنین، شواهدی از تأثیر منیزیم بر افزایش زیست-فعالی شیشه‌های زیست‌فعال [۳۲-۳۴]، به عبارتی، نقش غیرقابل ملاحظه آن بر شکل‌گیری هیدروکسی-آپاتیت، بیان شده است [۳۵]. ارول^۸ و همکاران [۳۴]، بیان کردند که MgO

² Wu³ Vascular Endothelial Growth Factor⁴ Li⁵ Ye⁶ Hydroxy-Apatite (HA)⁷ In Vitro⁸ Erol¹ Endothelial

رخ دهد و سبب نگرانی جراحان شود [۴۰]. عفونت‌های باکتریایی، می‌تواند سبب تعویق فرآیند ترمیم زخم و حتی عدم موفقیت جراحی‌ها شود [۴۱]. جایگزینی این مواد، نیازمند سازوکارهای حفاظتی بیشتری برای جلوگیری از رشد هرگونه باکتری است [۴۲]؛ بنابراین، شرط جایگذاری ایمپلنت‌های طراحی شده برای کاربردهای درمانی خاص، وجود حداکثر الزامات ضدعفونی شده ممکن است [۴۳].

همان‌طور که در بالا اشاره شد، هردو شیشه‌ی زیست-فعال حاوی منیزیم و مس، دارای تأثیر مثبت بر رگ‌زایی و استخوان‌زایی و در برخی موارد، فعالیت‌های ضدباکتریایی هستند. هر دوی آن‌ها، به‌صورت مجزا، به‌عنوان دوپنت‌های شیشه‌های زیست‌فعال، مورد استفاده قرار می‌گیرند. جستجوی پژوهش‌ها حاکی است که هیچ مطالعه مقایسه‌ای، در زمینه‌ی سنتز و کاربرد برون‌تنی شیشه زیست‌فعال 58S حاوی منیزیم و مس، انجام نشده است. از این‌رو، این مطالعه، به بررسی تأثیر جایگزینی هم‌زمان MgO/CuO به جای CaO، بر زیست‌فعالی، زیست‌سازگاری، فعالیت ALP و ضدباکتریایی شیشه‌های 58S زیست‌فعال حاوی منیزیم و مس می‌پردازد و مقدار بهینه‌ی درصد مس و منیزیم در ترکیب شیشه زیست‌فعال 58S را به‌منظور دستیابی به بهترین فعالیت تکثیر سلولی و ضدباکتریایی در برابر باکتری MRSA^۹ پیشنهاد می‌دهد. لذا، با استناد به نتایج پژوهش‌های پیشین مبتنی بر مقدار بهینه ۵ درصد مولی مس در ساختار، این مقدار، برای مس، انتخاب شد. سپس، باهدف یافتن مقدار بهینه‌ی حضور هم‌زمان منیزیم و مس، مقدار منیزیم در ترکیب نمونه‌های سنتز شده، در محدوده صفر تا ده درصد مولی، به همراه ۵ درصد مولی مس، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، تأثیر CuO/MgO بر فعالیت برون‌تنی شیشه‌های زیست‌فعال، با غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول SBF و مشاهده تغییرات مورفولوژی لایه هیدروکسی‌کربنات-آپاتایت (HCA) تشکیل شده روی سطوح شیشه‌های زیست‌فعال و تشکیل برون‌تنی (HCA) بوسیله‌ی ICP-AES، FTIR، XRD و SEM نیز مورد بررسی قرار گرفت. سپس، آزمون‌های فعالیت ALP و MTT برای تکمیل تحقیقات زیستی و فعالیت ضد باکتریایی MRSA شیشه‌های زیست‌فعال نیز انجام شد.

در شیشه‌های زیست‌فعال CaO-SiO₂-P₂O₅-MgO، می‌تواند میزان شکل‌گیری لایه هیدروکسی-آپاتایت را افزایش دهد. همچنین، در مطالعه پرابهو^۱ [۳۳]، برخی شیشه‌های زیست‌فعال حاوی منیزیم (۱۰ درصد مولی)، زیست‌فعالی بیشتری را در مقایسه با شیشه‌های زیست‌فعال بدون منیزیم نشان دادند. از طرف دیگر، سالیناز^۲ و همکاران [۳۶]، اعتقاد داشتند که افزایش مقدار MgO در SiO₂-CaO-MgO، ممکن است زیست‌فعالی برون‌تنی را تحت تأثیر قرار ندهد. ما^۳ و همکاران [۳۰]، بیان کردند که جایگزینی MgO (از ۰ تا ۲۰ درصد مولی) با CaO در شیشه‌های زیست‌فعال حاصل از روش سل-ژل، تشکیل لایه هیدروکسی-آپاتایت را به تعویق می‌اندازد. با این وجود، تاکنون، حداکثر میزان جایگزینی MgO/CuO در ترکیب شیشه زیست‌فعال که توانایی بهبود فعالیت و تکثیر سلولی را داشته باشد، تعیین نشده است. صبوری و همکاران، نشان دادند که شیشه زیست‌فعال با ترکیب SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO حاوی ۵ درصد مولی MgO، سبب تفکیک سلول‌های استخوان‌ساز جنینی (hFOB-1.19) می‌شود [۳۷]. وانگ^۴ و همکاران [۳۸]، گزارش کردند که شیشه‌های زیست‌فعال SiO₂-CaO-P₂O₅ دوپ شده با ۲/۲۵ درصد مولی MgO، سبب فعالیت ALP و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی^۵ بیشتری می‌شود. هرچند بالامورگان^۶ و همکاران [۳۹]، اذعان کردند که شیشه‌های زیست‌فعال SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO با ۱۳ درصد مولی MgO، فعالیت و تکثیر سلول‌های شبه‌استخوانی انسان (MG63) را افزایش می‌دهد. درنهایت، پرابهو و همکاران [۳۳]، تأثیر جایگزینی ۱۰ درصد مولی CaO با MgO را در شیشه زیست-فعال با ترکیب ۵۸SiO₂-۳۳CaO-۹P₂O₅ (درصد مولی) بر فعالیت و تکثیر سلول‌های آدینوکارسیوم^۷ معده‌ی انسان (AGS)، گزارش کردند.

مسئله حائز اهمیت در مقوله مواد زیستی ایمپلنت^۸، عفونت‌های پیرامون آنها است که می‌تواند به دلایل مختلف،

¹ Prabhu

² Salinas

³ Ma

⁴ Wang

⁵ Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

⁶ Balamurugan

⁷ Gastric Adenocarcinoma

⁸ Implant

⁹ Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

تترا اتیل اورتو سیلیکات (TEOS-800658)، فسفریک اسید تری اتیل استر (TEP-821141)، کلسیم نیترات-۴ آبه (Ca(NO₃)₂.4H₂O-102121)، مس (II) نیترات-۳ آبه (102753) و منیزیم نیترات-۶ آبه (105853)، برای سنتز شیشه زیست فعال 58S حاوی منیزیم و مس، به ترتیب، به عنوان پیش-ماده‌های SiO₂، CaO، P₂O₅، CuO و MgO استفاده شدند. همچنین، K₂HPO₄.3H₂O، KCl (104936)، NaCl (106404)، (105099)، MgCl₂.6H₂O (105833)، CaCl₂ (102378)، Na₂SO₄ (106649)، تری (هیدروکسی متیل) امینومتان (HOCH₂)₃CNH₂ (252859) و HCl (100317)، برای آماده-سازی SBF طبق فرمول معرفی شده استفاده شد [۴۴]. تمام مواد شیمیایی از مرک (آلمان) خریداری و به طور مستقیم، بدون هرگونه خالص سازی بیشتر، استفاده شد. برای تحقیقات زیستی، رده سلولی استئوبلاست^۱ موش MC3T3-E1، از سیگما آلد ریچ^۲ (انگلستان) خریداری و استفاده شد. کشت سلول‌ها در محیط α-MEM حاوی ۲ mM گلوتامین و یک درصد آنتی بیوتیک پنیسیلین-استرپتومیسین و سرم فتال بوین (۱۰ درصد، سیگما آلد ریچ، انگلستان) انجام شد و در شرایط محیطی هوای مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، درون انکوباتور^۳، نگهداری شد. محیط کشت، دو روز یکبار، به طور کامل، تعویض شد. سلول‌های سالم با تریپسین^۴ جدا شدند و دوباره، به منظور انجام آزمایش‌های زیستی بعدی، در ظروف مناسب، کشت داده شدند.

۲-۲- سنتز شیشه‌های زیست فعال

شیشه‌های زیست فعال 58S حاوی مس، در سیستم (برحسب) $x\text{MgO}-(x-31)\text{CaO}-5\text{CuO}-4\text{P}_2\text{O}_5-60\text{SiO}_2$ درصد مولی، درحالی که X برابر ۰، ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۰ است، به روش سل-ژل سنتز شدند. ابتدا، آب مقطر، اسید نیتریک ۰/۱ M و تتوس (TEOS) با یک همزن مغناطیسی، به مدت

یک ساعت، در دمای اتاق، مخلوط شد. سپس TEP، کلسیم نیترات-۴ آبه، مس (II) نیترات-۳ آبه و منیزیم نیترات-۶ آبه، به ترتیب و با فاصله زمانی ۴۵ دقیقه‌ای، برای همگن سازی مناسب اضافه شدند. برای اطمینان از انجام کامل هیدرولیز، ترکیب نهایی، به مدت یک ساعت دیگر، همزده شد. محلول آماده شده (سل)، درون محفظه‌ای از جنس تفلون، ریخته شد و پس از نگهداری به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۵ درجه سلسیوس خشک شد. در نهایت، ژل خشک شده، به منظور حذف نیترات‌ها و دیگر باقی مانده‌های آلی، به مدت ۳ ساعت در کوره با دمای ۷۰۰ درجه سلسیوس، نگهداری شد. کلوخه‌های خشک شده، پس از انتقال به دستگاه آسیاب گلوله‌ای از جنس زیرکونیا، به پودری با ذرات ریز (با اندازه ذرات کمتر از ۵۰ میکرومتر)، تبدیل شدند. در ادامه، پودرهای به دست آمده، تحت فشار پرس هیدرولیکی ۹ MPa، به شکل قرص (∅ ۳×۱۰)، شکل دهی شدند. ترکیب شیمیایی شیشه‌های زیست فعال (BG) سنتز شده، در جدول ۱، ارائه شده است.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی شیشه‌های زیست فعال سنتز شده (برحسب درصد مولی)

Glass	Label	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	CuO	MgO
58S-0 % CuO-0 %MgO	BG-0/0	۶۰	۳۱	۴	۵	۰
58S-5 % CuO-1 %MgO	BG-5/1	۶۰	۳۰	۴	۵	۱
58S-5 % CuO-3 %MgO	BG-5/3	۶۰	۲۸	۴	۵	۳
58S-5 % CuO-5 %MgO	BG-5/5	۶۰	۲۶	۴	۵	۵
58S-5 % CuO-8 %MgO	BG-5/8	۶۰	۲۳	۴	۵	۸
58S-5 % CuO-10 %MgO	BG-5/10	۶۰	۲۱	۴	۵	۱۰

۲-۳- آماده سازی SBF

محلول SBF، به روش Kokubo آماده شد [۴۴]. سدیم-کلرید (NaCl)، پتاسیم کلرید (KCl)، سدیم بی کربنات (NaHCO₃)، سدیم سولفات (Na₂SO₄)، منیزیم کلرید-۶ آبه (MgCl₂.6H₂O)، کلسیم کلرید (CaCl₂)، دی-پتاسیم هیدروژن فسفات-۳ آبه (K₂HPO₄.3H₂O) و TRIS، در آب مقطر، حل شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، با افزودن هیدروکلریک اسید (HCl, 1N)، pH محلول، در ۷/۲۵، تنظیم شد.

¹ Osteoblast² Sigma-Aldrich³ Incubator⁴ Trypsin

۲-۴- مشخصه‌یابی شیشه‌های زیست‌فعال

۲-۴-۱- آنالیزهای حرارتی

آنالیز حرارتی تفاضلی^۱ (DTA) و وزن سنجی^۲ (TGA)، روی شیشه‌های زیست‌فعال BG-5/0^۳ و BG-5/10، به‌منظور اندازه‌گیری دمای مناسب تف‌جوشی ژل‌های خشک شده، انجام شد. از دستگاه Shimadzu TGA-50، در بازه دمایی 1100 ± 25 درجه سلسیوس، برای ثبت گرمانگارهای DTA (Thermograms) و TGA، با دبی 60 ml.min^{-1} گاز N_2 و نرخ گرمایش $10/5^\circ\text{C.min}$ استفاده شد.

۲-۴-۲- پراش پرتو ایکس (XRD)

تغییرات ترکیبی فاز شیشه‌ی زیست‌فعال، قبل و بعد از غوطه‌وری در محلول SBF، با دستگاه پراش پرتو X (XRD, INEL-Equinox-3000, France)، مورد بررسی قرار گرفت. سطح شیشه زیست‌فعال انتخاب شده BG-5/5، به دلیل نتایج تکثیر سلولی، ALP و MTT، توسط پرتو ایکس Cu K α با طول موج 1.5405 \AA و 40 KV در فاصله $20^\circ \leq 2\theta \leq 50^\circ$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۴-۳- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FTIR)

تشکیل فاز هیدروکسی-آپاتایت روی سطح شیشه زیست‌فعال BG-5/5، به کمک FTIR (Nicolet Avata 660, Nicolet) ارزیابی شد. ماده جداشده از سطح شیشه زیست‌فعال BG-5/5 (1 mg)، با KBr (100 mg, Spectroscopy grade) مخلوط و تحت خلأ بسته‌بندی شد و در بازه‌ی طول موج $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ با قدرت تفکیک 8 cm^{-1} اسکن شد.

۲-۴-۴- طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی (ICP-AES)

غلظت یون‌های کلسیم، سیلیسیم، فسفر، مس و منیزیم در محلول SBF، توسط ICP-AES (Varian Vista Pro, Palo Alto, USA) اندازه‌گیری شد. در آزمایشات برون‌تنی، شیشه‌های زیست‌فعال دایره‌ای شکل، درون محلول SBF، به مدت ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در دمای 37°C درجه سلسیوس، به‌صورت

غوطه‌ور نگهداری شدند. نسبت مساحت سطح شیشه‌های زیست‌فعال به حجم SBF، ثابت (حداکثر $1 \text{ cm}^2.\text{mL}^{-1}$) نگه‌داشته شد. در فواصل زمانی غوطه‌وری، شیشه‌های زیست‌فعال دایره‌ای شکل، از محلول SBF خارج و به آرامی با آب مقطر، شسته شدند و در دمای اتاق خشک شدند. پس از شناسایی تمامی یون‌های ذکرشده درون SBF، مقدار غلظت آن‌ها با مقادیر اصلی مقایسه شد.

۲-۴-۵- اندازه‌گیری pH

از pH سنج کالیبره شده (Corning 340, USA) برای اندازه‌گیری میزان pH محلول SBF در هنگام غوطه‌وری شیشه‌های زیست‌فعال استفاده شد (شکل ۵).

۲-۴-۶- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

ارزیابی تغییرات مورفولوژی سطح شیشه زیست‌فعال BG-5/5، به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Philips XL30, Netherland) انجام شد. تأثیر منیزیم بر هیدروکسی-آپاتایت تشکیل شده بعد از غوطه‌وری شیشه زیست‌فعال BG-5/5 در SBF، در ابعاد نانو، مورد بررسی قرار گرفت. آماده سازی نمونه‌های SEM، با پوشش‌دهی لایه‌ای از طلا (Au)، روی نمونه شیشه زیست‌فعال، به روش کندوپاش (EMITECH K450X, England) انجام شد.

۲-۵-۵- ارزیابی‌های زیستی

۲-۵-۱- آزمون MTT

آزمون MTT، به‌منظور تشخیص و اندازه‌گیری قابلیت زیست و تکثیر سلول‌های MC3T3-E1 کشت شده روی سطح شیشه‌های زیست‌فعال برای ۱، ۳ و ۷ روز انجام شد. ابتدا، سلول‌ها روی شیشه‌های زیست‌فعال درون ظروف ۹۶ تایی با چگالی 6×10^3 سلول در هر چاله، با محلول DMEM، کشت و برای زمان‌های تعریف شده، نگه‌داشته شدند. در پایان مدت نگهداری (۱، ۳ و ۷ روز)، محلول کشت، خارج شد و $100 \mu\text{L}$ از محلول MTT (سیگماآلد ریچ) با غلظت 5 mg.ml^{-1} در محلول فسفات بافر شده نمک‌دار (PBS)^۴، به محلول کشت

¹ Differential Thermal Analysis

² Thermogravimetric Analysis

³ Bioactive Glass (BG)

⁴ Phosphate Buffered Saline (PBS)

۲-۵-۳- تحقیقات ضدباکتریایی

تأثیر حضور همزمان مس و منیزیم، روی فعالیت ضد باکتریایی شیشه‌های زیست‌فعال، در برابر باکتری MRSA، به روش از پیش توضیح داده شده، مورد بررسی قرار گرفت [۴۸]. ابتدا، باکتری‌های MRSA کشت شده در مایع کشت Lysogenybroth (LB)، برای رسیدن به غلظت حداکثر 10^8 mL^{-1} تا 10^9 mL^{-1} رقیق شدند [۴۸]. سپس، 0.9 mL محلول (LB)، به درون لوله‌های 1.5 mL Eppendorf (۱/۵) ضد عفونی شده، منتقل و برای یک دقیقه تکان داده شد. در ادامه، سوسپانسیون^{۱۰} باکتری (0.1 mL) به درون لوله‌ها، اضافه و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شد. پس از به غلظت رساندن این سوسپانسیون‌ها ($20 \mu\text{L}$) به درون ظروف لبه‌دار حاوی LB منتقل شدند و در طول شب، در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در نهایت، واحد نهایی تشکیل کلونی در هر میلی‌لیتر (CFU/mL)، شمارش شد و با توجه به رابطه زیر، درصد ضدباکتریایی محاسبه شد [۴۸، ۴۹].

$$\text{درصد ضد-باکتریایی} = 1 - \frac{(\text{تعداد باکتری ها زنده مانده})}{\text{تعداد کل باکتری ها}}$$

۲-۵-۴- آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از بسته‌ی نرم‌افزاری GraphPad Prism (V. 3.0, GraphPad Prism, USA) انجام گرفت. آنالیزهای سلولی و عنصری، روی سه نمونه از هر گروه، بررسی شد. آمار توصیفی، با استفاده از انحراف معیار و مقادیر متناظر P در $P < 0.05$ ، بدست آمد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیزهای حرارتی

گرمانگارهای DTA و TGA حاصل از نمونه‌های شیشه زیست‌فعال که حاوی کمترین و بیشترین مقدار منیزیم هستند، به ترتیب، در شکل ۱ (الف و ب) نشان داده شده است. باید توجه داشت که کاهش وزن نمونه‌ها، طی مراحل سه‌گانه‌ای اتفاق افتاده است؛ این مراحل را می‌توان، به ترتیب، به تبخیر

اضافه شد. بعد از چهار ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، محلول کشت، به وسیله پیت^۱ خارج شد و دی‌متیل سولفکساید (DMSO، سیگما) برای انحلال بلورهای فورمازان^۲ به آن اضافه شد. در نهایت، توسط دستگاه ریزصفحه خوان (EL 312e Biokinetics reader, Biotek Instruments) با طول موج ۵۷۰ نانومتر، چگالی نوری^۳ (OD)، محلول‌ها ضبط شد. همچنین سلول‌ها در عدم حضور شیشه زیست‌فعال به‌عنوان نمونه کنترل، کشت شدند.

۲-۵-۲- فعالیت آلكالاین فسفاتاز (ALP)

فعالیت ALP یکی از الگوهای فنوتیپیک^۴ برای تفکیک و تکثیر سلول‌های استخوانی است که بر اساس روش لاوری^۵ و همکاران، با استفاده از پی-نیتروفنیل^۶ فسفات اندازه‌گیری شد [۴۵]. بر این اساس، ALP سلولی، با ارزیابی تغییر پی-نیتروفنیل فسفات به پی-نیتروفنول^۷، اندازه‌گیری شد [۴۶]. فعالیت آنزیم هر نمونه با جذب اندازه‌گیری شده در ۴۱۰ نانومتر و مقدار پی-نیتروفنیل آزاد شده، ارزیابی شده است [۴۷]. این فرآیند، با توجه به راهنمایی‌های شرکت سازنده، انجام گرفت (BioCat, Heidelberg, Germany). ابتدا، سلول‌ها شمارش شدند و درون ظرف ۲۴ تایی با چگالی $1 \times 10^4 \text{ Cells.cm}^{-2}$ قرار گرفتند و به همراه شیشه‌های زیست‌فعال، در فضایی مرطوب حاوی ۵ درصد CO_2 با دمای ۳۷ درجه سلسیوس، کشت شدند. بعد از ۱، ۳ و ۷ روز، مایع شناور روی آن‌ها با دقت فراوان خارج شد و لایه‌ی سلول‌ها، به‌طور آهسته، با محلول PBS شسته شد. در ادامه، یک میلی‌لیتر تریس بافر^۸ به آن، اضافه شد و تا زمان همگن شدن کامل، هم-زده شد. $20 \mu\text{L}$ از سطح برداشته‌شده از محلول، در محلول پی-نیتروفنیل فسفات^۹ (1 mL ، 1.6 mmol.L^{-1} ، Sigma) مخلوط شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه نگهداری شد. نمونه‌های کنترل نیز، به‌طور مشابه، به‌صورت بالا، آماده شد.

¹ Pipette

² Formazan

³ Optical Density

⁴ Phenotypic Markers

⁵ Lawry

⁶ p-nitrophenyl

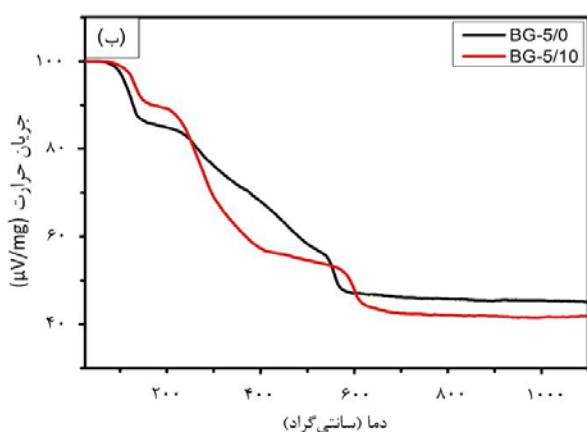
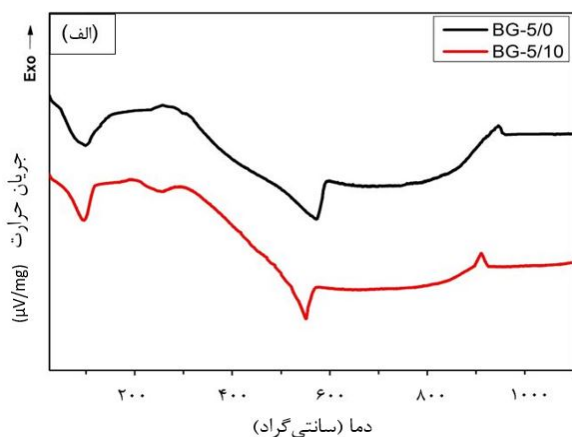
⁷ p-nitrophenol

⁸ Tris Buffer

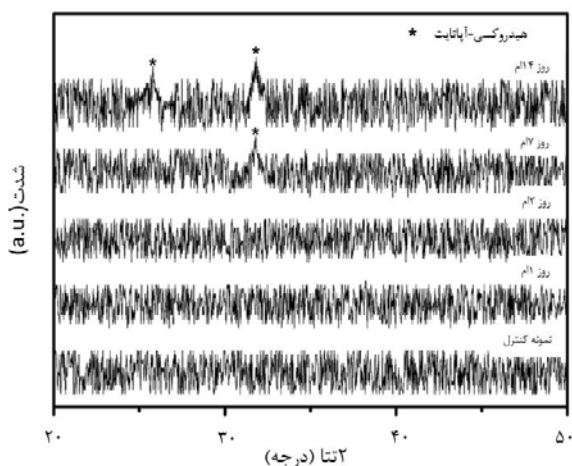
⁹ p-nitrophenyl Phosphate

¹⁰ Suspension

افزایش تدریجی در شدت پیک صفحه‌ی (۲۱۱) نیز، از روز هفتم تا چهاردهم مشاهده شد. بر این اساس، نتایج XRD ثابت کرد که شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5، قادر به تشکیل هیدروکسی آپاتیت برون‌تنی است.



شکل ۱. گرمانگارهای (الف) DTA و (ب) TGA شیشه‌های زیست-فعال BG-5/0 و BG-5/10 (± 5 - ۱۱۰ - ۳۰ درجه سلسیوس)



شکل ۲. الگوهای XRD شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5 قبل و بعد از ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول SBF

آب، تراکم سیلانول‌ها و حذف شدن نیترات‌ها نسبت داد. اولین پیک گرماگیر DTA، در حدود ۱۴۰ درجه سلسیوس، نشان-دهنده‌ی تبخیر آب شیشه‌های زیست‌فعال است. در حالیکه، تراکم سیلانول‌ها و حذف شدن نیترات‌ها، در بازه‌ی ۲۲۰ و ۶۰۰ درجه سلسیوس اتفاق می‌افتد [۱۷، ۳۷ و ۵۰]. زمانی که نیترات‌ها، به‌طور کامل (در دمای بالاتر از ۶۰۰ درجه سلسیوس)، حذف می‌شوند، گرمانگارهای TGA، بین ۴۳ تا ۴۸ درصد قرار می‌گیرند و هیچ‌گونه تغییر بیشتری نشان نمی‌دهند. پیک‌های تبلور (گرماده) شیشه‌های زیست‌فعال BG-5/0 و BG-5/10، به ترتیب در حدود ۹۵۰ و ۹۰۰ درجه سلسیوس، نمایان می‌شوند. با مقایسه منحنی‌های TGA نمونه با و بدون منیزیم، می‌توان گفت که حضور منیزیم، باعث تغییرات در شیب منحنی می‌شود. نرخ تبخیر در منحنی نمونه BG-5/0، در ابتدا، بیشتر از منحنی نمونه BG-5/10 است. در نهایت، می‌توان گفت حضور منیزیم، باعث به تعویق افتادن فرآیند پایدارسازی شیشه‌ی زیست‌فعال می‌شود. علت این تعویق و افزایش دمای پایدارسازی شیشه زیست‌فعال، شعاع یونی کوچکتر منیزیم نسبت به کلسیم است که موجب تراکم بیشتر ساختار شیشه‌ی زیست‌فعال و مانع از خروج سریع آب و نیترات‌ها می‌شود. با توجه به نتایج آنالیزهای DTA/TGA، دمای ۷۰۰ درجه سلسیوس، به‌عنوان دمای مناسب برای پایدارسازی شیشه‌های زیست‌فعال حاوی منیزیم و مس انتخاب شد.

۳-۲- تجزیه و تحلیل فاز

الگوهای XRD شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5 با زمان-های مختلف غوطه‌وری در محلول SBF، در شکل ۲ نشان داده شده‌است. ویژگی ساختار آمورف شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5، قبل از غوطه‌ور شدن، توسط XRD، تأیید شد. بعد از غوطه‌وری در ۱ و ۳ روز، سطح شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5، آمورف به نظر می‌رسید و طبیعت شیشه‌ای آن، با عدم رؤیت هیچ پیکی در XRD، تأیید شد. بر اساس کارت‌های استاندارد (JCPDS 09-432؛ HA)، پیک‌های مشخصه‌ی پراش در مقادیر ۲θ برابر با ۲۵/۸° و ۳۱/۸°، به ترتیب، مؤید صفحات اتمی (۲۰۰) و (۲۱۱) در شبکه HA است [۵۱]. پس از ۷ روز غوطه‌وری، پیکی در حال نمایان شدن در ۳۱/۸ درجه (شکل ۲) و ۷ روز بعد، پیک دیگری در ۲۵/۸ درجه، شناسایی شد و

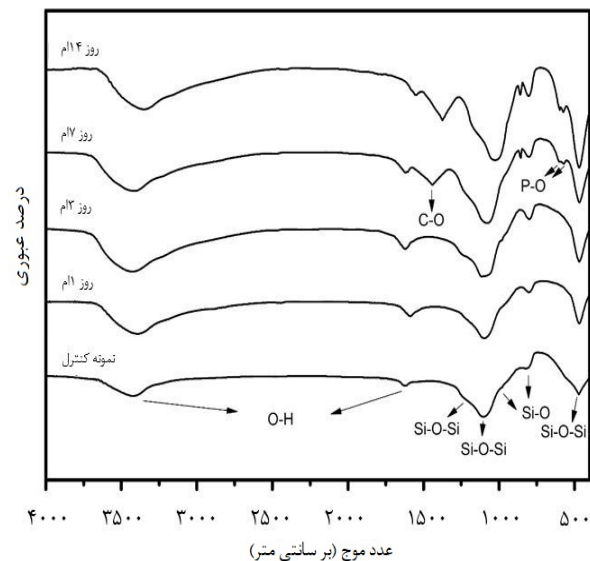
۳-۳- گروه‌های ساختاری

600 cm^{-1} ، به HA بلورین نسبت داده شد [۵۵]. بنابراین، طیف FTIR، با آشکارسازی ماهیت بلورین ماده‌ی تازه تشکیل شده روی سطح شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5، با الگوهای XRD، مطابقت می‌کند.

۳-۴- شیمی یونی^۱ محلول SBF

شکل ۴ (الف) تا (ه)، تغییرات غلظت Ca، Si، P، Cu و Mg را در محلول SBF، برای زمان‌های مختلف غوطه‌وری در محلول SBF، نشان می‌دهد. بر این اساس، در طول ۳ روز اول غوطه‌وری، غلظت Ca در شیشه‌های زیست‌فعال BG-5/0، BG-5/1، BG-5/3، BG-5/8 و BG-5/10، از میزان 100 mg/L ، به ترتیب، به مقادیر $305/9$ ، $299/7$ ، $290/1$ ، $279/3$ ، $287/4$ و $279/6 \text{ mg/L}$ افزایش یافت؛ این مقادیر، به تدریج، در روزهای بعد، کاهش یافت و در روز هفتم غوطه‌وری، برای شیشه‌های زیست‌فعال BG-5/0، BG-5/1، BG-5/3 و BG-5/5، به ترتیب، به مقادیر $191/3$ ، $188/1$ ، $185/3$ و $180/7 \text{ mg/L}$ رسید؛ در حالی‌که شیشه‌های زیست‌فعال BG-5/8 و BG-5/10، دارای روندی متفاوت بودند و به ترتیب، به $154/4$ و $159/8 \text{ mg/L}$ رسیدند. روند تغییرات غلظت یون کلسیم، تا روز تشکیل هیدروکسی آپاتایت، افزایشی بود و پس از تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت، افت ناگهانی غلظت یون کلسیم، اتفاق افتاد. علت این تغییرات غلظت یون کلسیم را می‌توان بر اساس سازوکاری که قبل‌تر پیشنهاد شده بود، تشریح کرد [۵۶]؛ بدین‌صورت که وقوع انحلال یون‌های کلسیم BG در محلول SBF و سپس رسوب یون‌های Ca از محلول SBF بر سطح BG در طی تبلور HA، موجب کاهش ناگهانی غلظت یون کلسیم می‌شود. این فرضیه، با نتایج XRD و FTIR شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5 که بعد از روز اول غوطه‌وری، هیچ پیک HA نشان نداد و برای مدت زمان‌های طولانی‌تر تا روز هفتم غوطه‌وری نیز، هیچ تغییری در نتایج XRD و FTIR مشاهده نشد، تأیید شد. علاوه بر این، BG با مقادیر بالای Mg، مانند BG-5/8 و BG-10/5، غلظت کلسیم بیشتری نسبت به سایر شیشه‌های سنتز شده که دارای مقادیر Mg پایین‌تر بودند، نشان دادند (شکل ۴-الف). شکل ۴-ب)، حلالیت ضعیف Si را که در حضور مقادیر Mg بیشتر، کاهش می‌یابد، نشان می‌دهد.

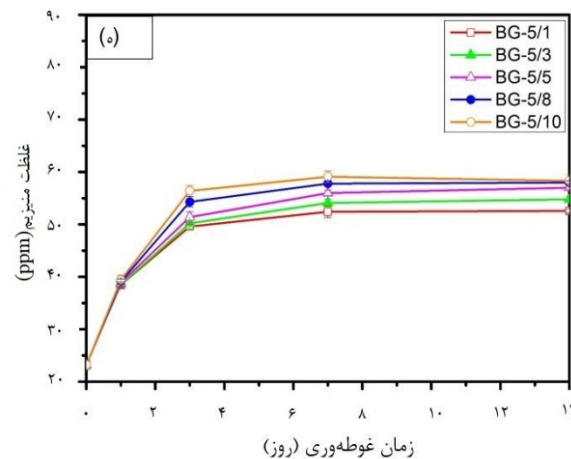
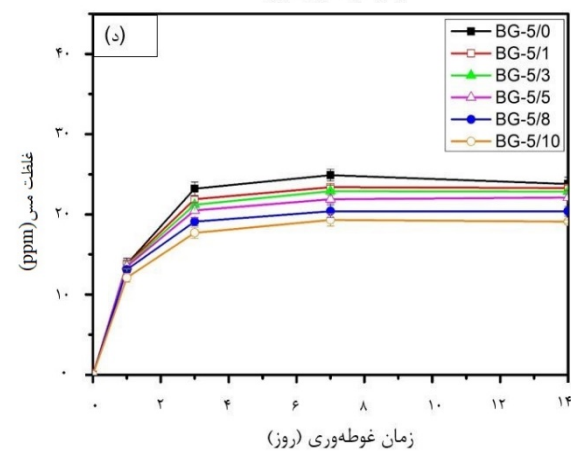
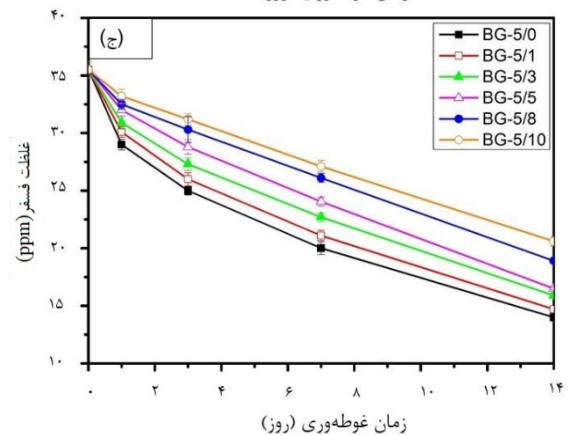
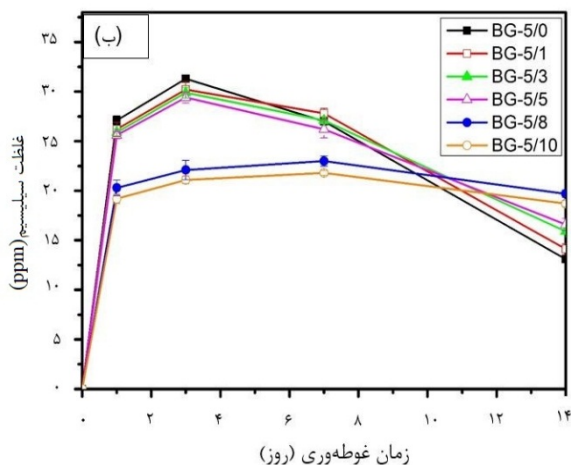
شکل ۳، طیف FTIR شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5 را قبل و بعد از غوطه‌وری در محلول SBF در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. BG-5/5، قبل از غوطه‌وری، فقط نشانه‌هایی از شبکه سیلیسی روی طیف FTIR خود، به دلیل حضور SiO_2 به‌عنوان جزء اصلی‌اش، نشان داد. در شکل ۳، باندهای مادون‌قرمز اصلی، در 470 ، 790 ، 922 ، 1066 و 1250 cm^{-1} نشان داده شده است که نشان‌دهنده‌ی شبکه سیلیسی است و به ترتیب، به خمش Si-O-CMSi، کشش متقارن اتم‌های اکسیژن مرتبط در Si-O در میان فضاهای چهاروجهی، باند کششی اتم‌های اکسیژن غیر مرتبط Si-O و باندهای متقارن و نامتقارن Si-O-Si نسبت داده می‌شود [۵۲]. نوارهای مادون‌قرمز (1609 cm^{-1}) PO_4^{3-} و گروه هیدروکسیل (3500 cm^{-1}) و نیز در شکل ۳ نشان داده شده است [۵۳].



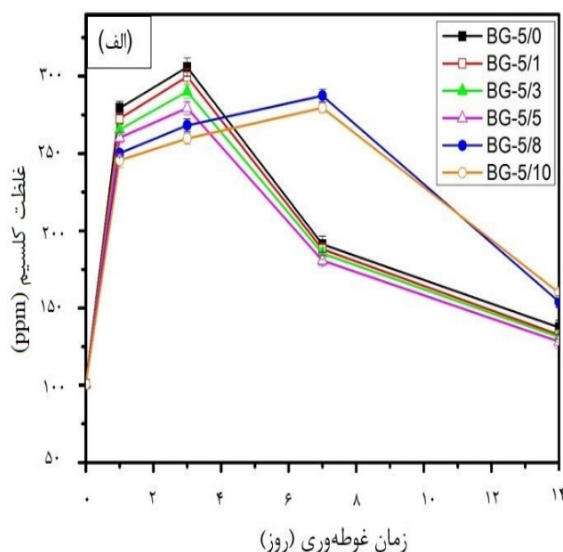
شکل ۳. طیف FTIR شیشه زیست‌فعال BG-5/5 قبل و بعد از ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز غوطه‌وری

نتیجه‌ی غوطه‌وری طولانی شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5، چند پیک FTIR جدید بود که تشکیل HA را بر روی سطحش تأیید می‌کرد [۵۴]. پس از ۷ روز غوطه‌وری در محلول SBF، ظهور دو قله FTIR در حدود 1455 و 870 cm^{-1} ، به کشش C-O کربنات‌های جایگزین فسفات در شبکه HA منسوب شد. همچنین، نوارهای جذب P-O، به صورت دو پیک شناسایی شده با شدت‌های افزایشی در 570 و

¹ Ion Chemistry



باتوجه به نتایج، شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/10، کمترین غلظت Si را نشان می‌دهد. در واقع، یون Mg^{2+} با شعاع یونی کوچکتر (۷۲ pm) نسبت به Ca^{2+} (۹۹ pm) و قدرت میدانی بالاتر، ساختار BG را تشکیل می‌دهد؛ این امر، مانع از نفوذ آسان SBF در داخل ساختار BG، قطع تبادل یون Si و غلظت کمتر یون سیلیسیم در نمونه‌های حاوی مقادیر بیشتر منیزیم می‌شود. با توجه به شکل ۴- (الف و ب)، آزادسازی سریع یون‌های Ca و Si از BG و تشکیل HA، می‌تواند به‌عنوان عامل اصلی در اتصال سریع شیشه‌ها به بافت‌های استخوانی در نظر گرفته شود [۵۷]. تغییرات غلظت فسفر در حین غوطه‌وری (شکل ۴- (ج))، نشان داد که افزایش مقدار Mg در BG، می‌تواند میزان رسوب‌دهی HA را کاهش دهد. شکل ۴- (د)، نشان می‌دهد که افزایش مقدار Mg، از ۱ تا ۱۰ درصد مولی در شیشه‌های زیست‌فعال 58S حاوی مس، باعث آزاد شدن یون‌های Cu می‌شود. این آزاد شدن آهسته‌ی یون‌ها را می‌توان به‌عنوان نشانه‌ی دیگری برای بست‌های محکم شبکه، به علت قدرت میدانی بالاتر یون Mg^{2+} در مقایسه با Ca^{2+} ، در نظر گرفت. شکل ۴- (د و ه)، نشان می‌دهد که در مراحل اولیه غوطه‌وری، غلظت‌های Mg^{2+} و Cu^{2+} تا حدود روز سوم افزایش می‌یابد؛ سپس، در روز هفتم، به مقدار ثابتی می‌رسد و پس از آن نیز ثابت باقی می‌ماند. این کاهش میزان انحلال یون‌های Mg^{2+} و Cu^{2+} ناشی از تشکیل لایه‌های پوشیده شده با HA غنی از سیلیس بر سطوح BG است.

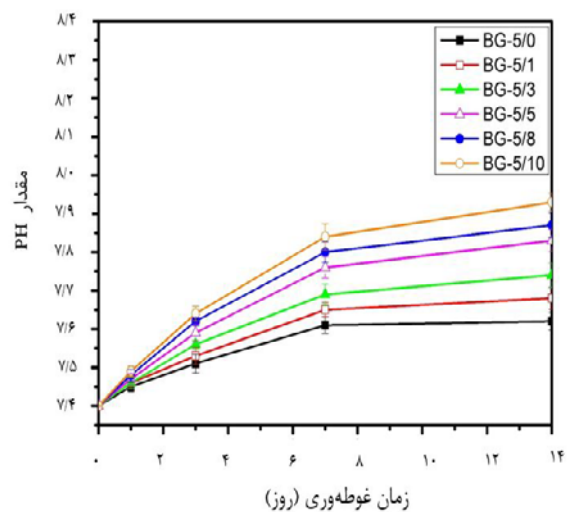
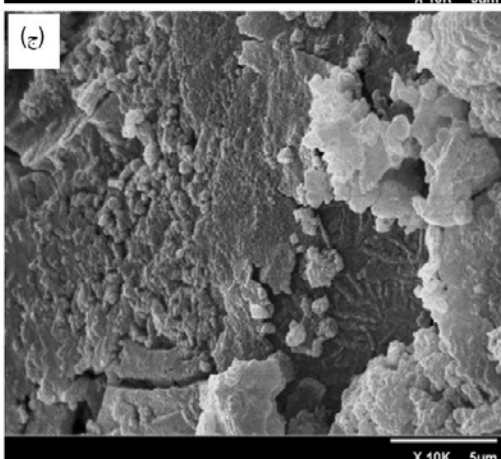
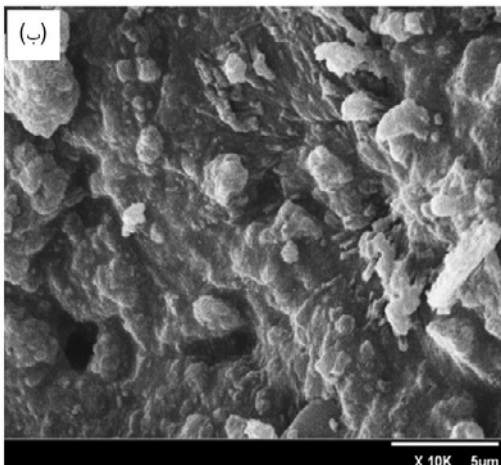
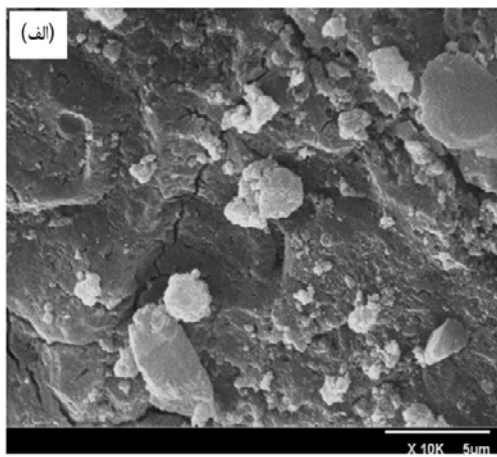


شکل ۴: غلظت یون‌های (الف) کلسیم، (ب) سیلیسیم، (ج) فسفر، (د) مس و (ه) منیزیم در محلول SBF در حین غوطه‌وری

۳-۵- اندازه گیری pH

مقادیر pH محلول SBF، در شکل ۵، نمایش داده شده است. تبادل Ca^{2+} ، Mg^{2+} ، Cu^{2+} و H^+ ، با مصرف پروتئین محلول SBF و نیز غلظت Mg^{2+} ، منجر به افزایش pH در زمان غوطه‌وری می‌شود. این افزایش pH، به علت کاهش غلظت Ca^{2+} ناشی از تشکیل HA، به تدریج کاهش می‌یابد [۵۲]. علاوه بر این، مقادیر pH در BG حاوی مقدار Mg بالاتر مانند BG-5/10 و BG-5/8، بیشتر از دیگر BG با مقدار Mg کمتر مانند BG-5/1، BG-5/3 و BG-5/5 است (شکل ۵).

آپاتایت پوشیده می‌شود. شکل ۶- (و)، بزرگنمایی بالایی از نانوذرات HA تشکیل شده روی سطح شیشه‌ی BG-5/5 پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF نشان می‌دهد. این مورفولوژی کرم‌مانند هیدروکسی‌آپاتایت روی سطح شیشه‌ی زیست‌فعال MgO-CaO-SiO_2 نیز توسط چن^۱ و همکاران [۵۸]، گزارش شده بود. با توجه به مشاهدات SEM، تشکیل HA روی سطح شیشه‌ی زیست‌فعال طی غوطه‌وری در محلول SBF، با نتایج FTIR و XRD، تناسب خوبی دارد.



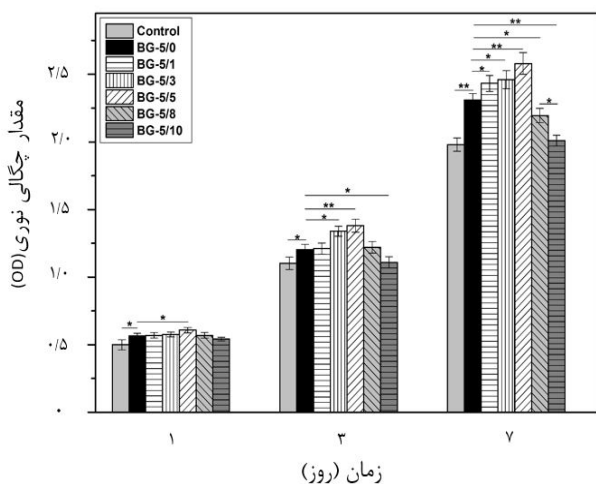
شکل ۵. مقادیر مختلف pH محلول‌ها حین غوطه‌وری شیشه‌های زیست‌فعال مختلف

۳-۶- ریزساختار سطح

ویژگی‌های مختلف شیشه‌های زیست‌فعال را می‌توان با بررسی تغییرات مورفولوژی سطوح، ارزیابی کرد [۱۱]. شکل ۶ (الف-و)، تصاویر SEM شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5 را قبل و بعد از غوطه‌وری در محلول SBF، نمایش می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود، قبل از غوطه‌وری در SBF (شکل ۶- (الف))، هیچ ذره‌ی HA وجود ندارد و طی دو روز بعد نیز، تغییرات مورفولوژیکی پرمعنایی، به جز بعضی از بخش‌های هسته‌ای HA، مشاهده نمی‌شود. در روز هفتم غوطه‌وری، سطح شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5، تا حدی توسط HA تشکیل شده برون-تنی، پوشش داده می‌شود (شکل ۶- (د)). با افزایش روزها و تکمیل لایه‌ی HA (شکل ۶- (ه))، سطح شیشه‌ی زیست‌فعال BG-5/5، به طور کامل، توسط لایه‌ی نانومتری از هیدروکسی-

¹ Chen

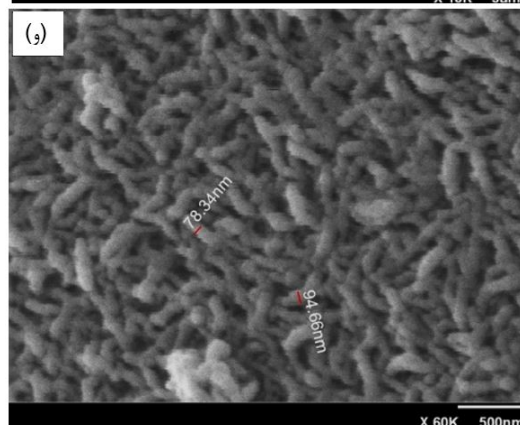
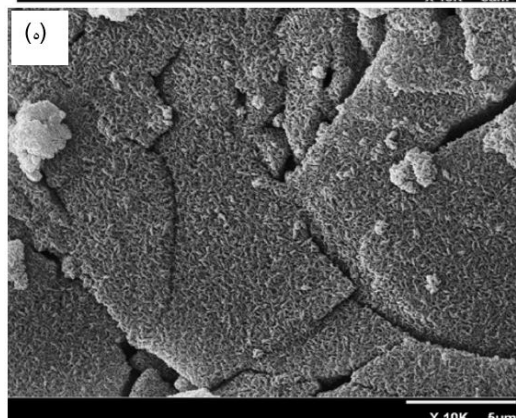
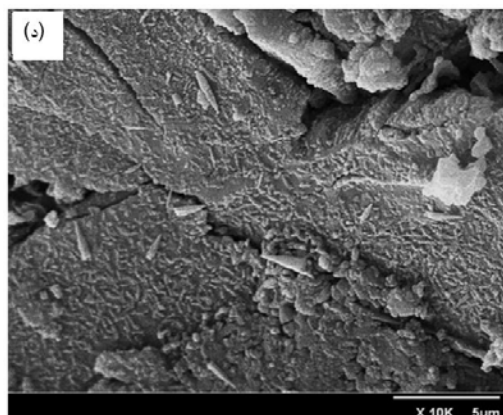
سلول‌های انکوباتور، با دیگر نمونه های BG، در مقایسه با نمونه کنترل، مشاهده نمی‌شود ($p > 0.05$). فعالیت MTT، پس از گذشت ۳ روز از کشت، در حضور یون‌های محلول در سلول‌های شیشه‌های BG-3/5 و BG-5/5، در مقایسه با نمونه کنترل ($p < 0.01$)، به طور قابل توجهی بیشتر می‌شود. در حالی- که سلول‌ها در حضور شیشه‌های زیست فعال BG- و BG-3/5 افزایش یکسانی را نشان می‌دهند (تفاوت آماری معناداری وجود نداشت ($p > 0.05$). مقادیر MTT، در طول زمان، افزایش می‌یابد و پس از ۷ روز، به بیشترین مقدار خود می‌رسد. پیش از این نیز، صبوری و همکاران [۳۷]، گزارش دادند که حضور ۵ درصد مولی منیزیم در شیشه‌ی زیست فعال $64SiO_2$ -٪ $26CaO$ -٪ $5MgO$ -٪ $5P_2O_5$ (بر اساس درصد مولی)، منجر به افزایش قابل توجه تکثیر سلول‌های استئوبلاست جنین انسان (hFOB 1.19) می‌شود. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش MTT، حضور همزمان ۵ مول Cu و Mg در ترکیب شیشه‌ی زیست فعال 58S (BG-5/5)، منجر به افزایش چشمگیری در میزان تکثیر سلول‌های MC3T3-E1 نسبت به BG-5/0 می‌شود ($p^{**} < 0.01$).



شکل ۷. تکثیر رده سلولی استئوبلاست مانند (MC3T3-E1) کشت- شده روی شیشه‌های زیست فعال سنتز شده به مدت ۱، ۳ و ۷ روز ($p^{**} < 0.01$) و ($p^* < 0.05$)

۳-۷-۲- فعالیت سلولی

فعالیت ALP سلول‌های استئوبلاست مانند^۱ (MC3T3-E1) کشت شده روی BG ها به مدت ۱، ۳ و ۷ روز، در شکل



شکل ۶. تصاویر SEM شیشه‌ی زیست فعال BG-5/5 (الف) قبل و بعد از (ب) ۱، (ج) ۳، (د) ۷ و (ه) ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF با بزرگنمایی ۱۰K و (و) بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری با بزرگنمایی ۶۰K

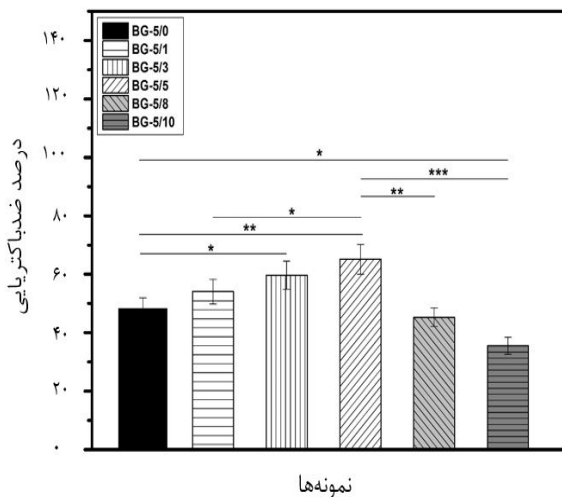
۳-۷-۱- ارزیابی زیستی برون‌تنی

۳-۷-۱- تکثیر سلولی

شکل ۷، تکثیر سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 را که روی شیشه‌های BG مختلف برای ۱، ۳ و ۷ روز کشت شده است، نشان می‌دهد. در روز اول کشت، نمونه‌ی شیشه‌ی BG-5/5، نسبت به نمونه‌ی کنترل و نمونه‌ی BG-0/5، افزایش معناداری را تکثیر سلول‌های استئوبلاست نشان می‌دهد ($p^* < 0.05$)؛ درحالی‌که هیچ تفاوت خاصی در فعالیت MTT

¹ Osteoblast-Like Cells

با افزایش مقدار منیزیم در ترکیبات BG (مانند BG-5/8 و BG-5/10)، فعالیت ضد-باکتریایی کاهش می‌یابد. سازوکار دقیق فعالیت ضد-باکتریایی شیشه‌های زیست‌فعال، هنوز در حاله ای از ابهام است [۵۹]. با این حال، برخی عوامل، مانند حضور یون‌هایی مثل کلسیم [۵۹]، فسفر [۵۹]، مس [۲۸، ۲۹، ۶۰]، منیزیم [۶۱] و همچنین، مقدار pH پیشنهاد شده به دلیل انتشار یون‌های قلیایی، ممکن است مؤثر باشند [۴۸، ۶۲]. براساس مطالعات ضد-باکتریایی در این کار، BG-5/3 و BG-5/5، اثرات ضد-باکتریایی بیشتری در برابر باکتری‌های MRSA نسبت به بقیه CM-BG‌های سنتز شده نشان دادند.

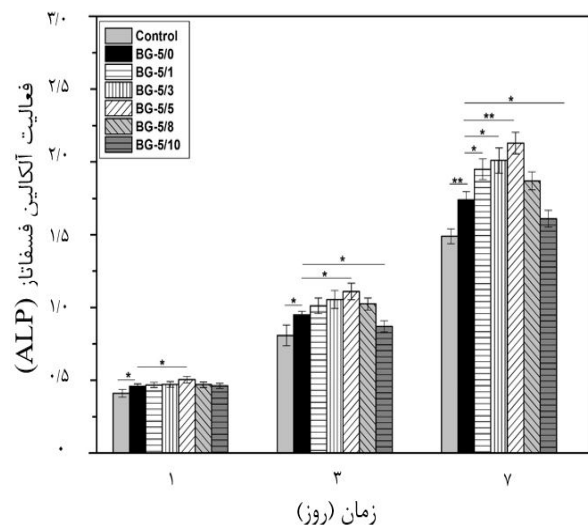


شکل ۹. درصد ضدباکتریایی شیشه‌های زیست‌فعال مختلف (p*** < ۰/۰۰۱) و (p** < ۰/۰۱) و (p* < ۰/۰۵)

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، با هدف بررسی اثر افزودن Cu و Mg به ترکیب شیشه‌ی زیست‌فعال 58S و با استفاده از روش سل-ژل، شش شیشه‌ی زیست‌فعال 58S با غلظت ثابت ۵ درصد مولی مس و غلظت متغیر منیزیم (در محدوده ۰ تا ۱۰ درصد مولی) در سیستم $(x-31)CaO-5CuO-6SiO_2-60P_2O_5$ (مولی) xMgO (x برابر با ۰، ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۰ درصد مولی)، به طور موفقیت‌آمیز سنتز شد. آزاد شدن نوارهای جذب کششی C-O و P-O در طیف FTIR، تشخیص پیک‌های مشخصه‌ی HA بلورین و تکامل مورفولوژی سطح با تشکیل HA بلورین در مقیاس نانو روی سطح شیشه‌ی زیست‌فعال 58S پس از غوطه‌وری در محلول SBF با ۵ درصد مولی CuO و ۵ درصد

۸ نمایش داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شود، فعالیت ALP، به طور مداوم، تا روز هفتم، افزایش می‌یابد. در روز هفتم، فعالیت سلول‌های ALP در تماس با BG‌ها، به حداکثر مقدار خود می‌رسد که تقریباً ۴ برابر بیشتر از روز اول است. هر دسته‌ی کشت، اختلاف آماری معنی‌داری را نشان می‌دهد که با فعالیت ALP سلول‌های درمان شده با BG-5/5 نسبت به BG-5/0 اندازه‌گیری می‌شود (p* < ۰/۰۵). جالب است که BG-5/5، بیشترین فعالیت ALP را در هر زمان کشت، دارد و با افزایش مقدار Mg از ۵ تا ۱۰ درصد مولی، کاهش فعالیت ALP، تناسب خوبی با نتایج MTT نشان می‌دهد. علاوه بر این، جایگزینی ۱۰ درصد مولی MgO به جای CaO در BG-5/10، فعالیت ALP سلول‌های MC3T3-E1 را در مقایسه با BG-5/0، به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (p* < ۰/۰۵).



شکل ۸. فعالیت ALP رده سلولی استئوبلاست مانند (MC3T3-E1) کشت‌شده روی شیشه‌های زیست‌فعال سنتز شده به مدت ۱، ۳ و ۷ روز (p* < ۰/۰۵) و (p** < ۰/۰۱)

۳-۷-۳- مطالعات ضدباکتریایی

همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است، حضور همزمان Cu و Mg در شیشه‌های زیست‌فعال 58S، موجب تأثیر ضد-باکتریایی قوی در برابر باکتری MRSA می‌شود. نمونه‌های حاوی ۳ و ۵ درصد مولی MgO (BG-5/3 و BG-5/5) در سوسپانسیون باکتریایی (با غلظت ثابت ۱۰ mg/mL)، بالاترین درصد ضد-باکتریایی را نسبت به باکتری‌های MRSA، بدون هیچ تفاوت خاصی نشان می‌دهند (p* < ۰/۰۵).

8. Ravarian, R., Moztaazadeh, F., Hashjin, M. S., "Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite", *Ceramics International*, Vol. 36, (2010), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.09.016>
9. Mehdikhani, M., Fathi, M. H., Mortazavi, V., Mousavi, S. B., "Preparation, characterization and bioactivity evaluation of sol-gel bioactive glass nano powder with three different compositions", *Journal of Advanced Materials and Technologies*, Vol. 2, (2010), 275-283. (In Farsi). <https://doi.org/10.30501/JAMT.2011.70220>
10. Moghanian, A., Firoozi, S., Tahriri, M., "Synthesis and in vitro studies of sol-gel derived lithium substituted 58S bioactive glass", *Ceramics International*, Vol. 43, (2017), 12835-12843. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.06.174>
11. Ma, J., Chen, C. Z., Wang, D. G., Shao, X., Wang, C. Z., Zhang, H. M., "Effect of MgO addition on the crystallization and in vitro bioactivity of glass ceramics in the CaO-MgO-SiO₂-P₂O₅ system", *Ceramics International*, Vol. 38, (2012), 6677-6684. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.05.056>
12. Moghanian, A., Sedghi, A., Ghorbanoghli, A., Salari, E., "The effect of magnesium content on in vitro bioactivity, biological behavior and antibacterial activity of sol-gel derived 58S bioactive glass", *Ceramics International*, Vol. 44, (2018), 9422-9432. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.02.159>
13. El-Kady, M., Ali, A. F., Rizk, R. A., Ahmed, M. M., "Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles", *Ceramics International*, Vol. 38, (2012), 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.05.158>
14. Wu, C., Zhou, Y., Xu, M., Han, P., Chen, L., Chang, J., Xiao, Y., "Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity", *Biomaterials*, Vol. 34, (2013), 422-433. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.066>
15. Du, R. L., Chang, J., Ni, S. Y., Zhai, W. Y., Wang, J. Y., "Characterization and in vitro bioactivity of zinc-containing bioactive glass and glass-ceramics", *Journal of Biomaterials Applications*, Vol. 20, (2006), 341-360. <https://doi.org/10.1177/0885328206054535>
16. Kilcup, N., Möncke, D., Kamitsos, E. I., Houizot, P., Célerié, F., Rouxel, T., Wondraczek, L., "Unanticipated stabilization of zinc-silicate glasses by addition of lanthanum: Implications for therapeutic inorganic ion delivery systems", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 429, (2015), 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.08.028>
17. Ma, J., Chen, C. Z., Wang, D. G., Hu, J. H., "Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of magnesium-doped sol-gel glass and glass-ceramics", *Ceramics International*, Vol. 37, (2011), 1637-1644. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.01.043>
18. Hoppe, A., Sarker, B., Detsch, R., Hild, N., Mohn, D., Starkb, W. J., Boccaccinia, A. R., "In vitro reactivity of Sr-containing bioactive glass (type 1393) nanoparticles", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 387, (2014), 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2013.12.010>
19. Baina, F., Novajraa, G., Miguez-Pachecob, V., Boccaccinib, R., Vitale-Brovaronea, C., "Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 432, (2016), 15-30. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.02.015>
20. Maguire, M. E., Cowan, J. A., "Magnesium chemistry and biochemistry", *Biomaterials*, Vol. 15, (2002), 203-210. <https://doi.org/10.1023/A:1016058229972>
21. Viering, M., de Baaij, J. H. F., Walsh, S. B., Kleta, R., "Genetic causes of hypomagnesemia, a clinical overview", *Pediatr Nephrol*, Vol. 32, (2017), 1123-1135. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3416-3>
22. Castiglioni, S., Cazzaniga, A., Albisetti, W., Maier, J. A. M., "Magnesium and osteoporosis: Current state of knowledge and future research directions", *Nutrients*, Vol. 5, (2013), 3022-3033. <https://doi.org/10.3390/nu5083022>
23. Belluci, M., Schoenmaker, T., Rossa-Junior, C., "Magnesium deficiency results in an increased formation of osteoclasts", *The*
- مولی MgO را (BG-5/5) تأیید شد. نتایج زیستی مطالعات برون تنی با سلولهای MC3T3-E1 نشان داد که BG-5/5، غیر-سمی است و به طور قابل توجهی تکثیر سلولی و فعالیت آلکالین فسفاتاز سلولهای MC3T3-E1 را افزایش می دهد. همچنین، BG-5/5، دارای بالاترین بازده ضد-باکتریایی در برابر باکتریهای MRSA در میان همه شیشه های زیست فعال 58S طراحی شده حاوی Cu/Mg در این پژوهش است؛ بنابراین، BG-5/5، به عنوان گزینه جدیدی با ویژگی های چند منظوره مناسب برای مهندسی بافت استخوان، معرفی می شود. یافته های حاصل از این پژوهش، مقدمه ای برای آغاز تحقیقات روی خواص درون تنی این شیشه های زیست فعال حاوی مس و منیزیم است.

۵- سپاسگزاری

بدینوسیله از سرکار خانم مهندس مهزاد حاجی مهدی تاجر که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تشکر می نمایم.

مراجع

- Dickson, G., Buchanan, F., Marsh, D., Harkin-Jones, E., Little, U., McCaigue, M., "Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration", *Technology and Health Care*, Vol. 15, (2007), 57-67. <https://doi.org/10.3233/THC-2007-15106>
- Sharma, B., Varghese, S., "Progress in orthopedic biomaterials and drug delivery", *Drug Delivery and Translational Research*, Vol. 6, (2016), 75-76. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0288-9>
- Kokubo, T., *Bioceramics and their clinical applications*, Elsevier Book, (2008). Available at: <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=RfSiAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=T.+Kokubo,+%22Bioceramics+and+their+clinical+applications%22.+Elsevier+Book,+2008&ots=2qMIuXXxh&sig=mxSspl-McJE3GvJf1c11yuQrks>
- Mozafari, M., Karbasi, S., Monshi, A., "Physical and mechanical properties of a poly-3-hydroxybutyrate-coated nanocrystalline Bioglass 45S5 scaffold for bone tissue engineering", *Journal of Advanced Materials and Technologies*, Vol. 2, (2008), 87-96. (In Farsi). <https://doi.org/10.30501/JAMT.2010.70145>
- Łączka, M., Cholewa-Kowalska, K., Osyczka, A. M., "Bioactivity and osteoinductivity of glasses and glassceramics and their material determinants", *Ceramics International*, Vol. 42, (2016), 14313-14325. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.06.077>
- Hench, L. L., "The story of Bioglass®", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 17, (2006), 967-978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>
- Sohrabi, M., Hesaraki, S., Kazemzadeh, A., Alizadeh, M., "The influence of sol-gel processing method on physical properties and acellular in vitro reactivity of bioactive glasses based on CaO-SiO₂-P₂O₅: Acidic catalysed single step process versus acid-base two step quick-gelling method", *Journal of Advanced Materials and Technologies*, Vol. 2, (2020), 31-36. (In Farsi). <https://doi.org/10.30501/JAMT.2011.70221>

- in vitro characterization", *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, Vol. 83, (2007), 546-553. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30827>
40. Namba, R. S., Inacio, M. C. S., Paxton, E. W., "Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty: an analysis of 56,216 knees", *The Journal of Bone & Joint Surgery*, Vol. 95, (2013), 775-782. <https://doi.org/10.2106/JBJS.L.00211>
 41. Yuan, K., Chan, Y., Kung, K., Lee, T., "Comparison of osseointegration on various implant surfaces after bacterial contamination and cleaning: A rabbit study", *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, Vol. 29, (2014), 32-40. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=08822786&AN=93923200&h=nPWjzUDarXRc1r4xj2lbdZ%2BNH3XEQkCbkc9jMVRTGZWWHu4Z6mPuVhZ7DRzHyyWkZe0UhVliwN6Q1eYmILmQ%3D%3D&crl=c>
 42. Kolmas, J., Groszyk, E., Kwiatkowska-Różycka, D., "Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties", *BioMed Research International*, Vol. 2014, (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/178123>
 43. Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C. R., "A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces", *Biomaterials*, Vol. 34, (2013), 8533-8554. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>
 44. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T., "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 24, (1990), 721-734. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>
 45. Elgendy, M., Norman, M. E., Keaton, A. R., Laurencin, C. T., "Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: An approach towards the development of a bone-bioerodible polymer composite material", *Biomaterials*, Vol. 14, (1993), 263-269. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90116-J](https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90116-J)
 46. Gotoh, Y., Hiraiwa, K., Nagayama, M., "In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone", *Bone and Mineral*, Vol. 8, (1990), 239-250. [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(90\)90109-S](https://doi.org/10.1016/0169-6009(90)90109-S)
 47. Yellowley, E., Jacobs, C. R., Donahue, H. J., "Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells", *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 15, (2000), 209-217. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.2.209>
 48. Hu, S., Chang, J., Liu, M., Ning, C., "Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 20, (2009), 281-286. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3564-5>
 49. Hu, S., Ning, C., Zhou, Y., Chen, L., Lin, K., Chang, J., "Antibacterial activity of silicate bioceramics", *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, Vol. 26, (2011), 226-230. <https://doi.org/10.1007/s11595-011-0202-8>
 50. Siqueira, R. L., Peitl, O., Zanotto, E. D., "Gel-derived SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ bioactive powders: synthesis and in vitro bioactivity", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 31, (2011), 983-991. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.02.018>
 51. Xiao, D., Tan, Z., Fu, Y., Duan, K., Zheng, X., Lu, X., "Hydrothermal synthesis of hollow hydroxyapatite microspheres with nano-structured surface assisted by inositol hexakisphosphate", *Ceramics International*, Vol. 40, (2014), 10183-10188. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.02.057>
 52. Mozafari, M., Moztarzadeh, F., Tahriri, M., "Investigation of the physico-chemical reactivity of a mesoporous bioactive SiO₂-CaO-P₂O₅ glass in simulated body fluid", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 356, (2010), 1470-1478. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.04.040>
 53. Kamalian, R., Yazdanpanah, A., Moztarzadeh, F., Ravarian, R., Moztarzadeh, Z., Tahmasbi, M., Mozafari, M., "Synthesis and characterization of bioactive glass/forsterite nanocomposites for bone implants", *Ceramics*, Vol. 56, (2012), 331-340. Corpus ID: 45218459. https://www.irsm.cas.cz/materialy/cs_content/2012/Kamalian_CS_2012_0000.pdf
 54. Vyas, V. K., Kumar, A. S., Prasad, S., Singh, S. P., Pyare, R., "Bioactivity and mechanical behaviour of cobalt oxide-doped *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 24, (2013), 1488-1498. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.12.008>
 24. Bernick, S., Hungerford, G. F., "Effect of dietary magnesium deficiency on the bones and teeth of rats", *Journal of Dental Research*, Vol. 44, (1965), 1317-1324. <https://doi.org/10.1177/00220345650440063401>
 25. Rude, R., Gruber, H. E., Wei, L. Y., Frausto, A., Mills, B. G., "Magnesium deficiency: Effect on bone and mineral metabolism in the mouse", *Calcified Tissue International*, Vol. 72, (2003), 32-41. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-1091-1>
 26. Saghiri, A., Asatourian, A., Orangi, J., Sorenson, C. M., Sheibania, N., "Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis—Part II: Cr, Si, Zn, Cu, and S", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol. 96, (2015), 143-155. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.011>
 27. Nasulewicz, A., Mazur, A., Opolski, A., "Role of copper in tumour angiogenesis—clinical implications", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Vol. 18, (2004), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2004.02.004>
 28. Li, J., Zhai, D., Lv, F., Yu, Q., Ma, H., Yin, J., Yi, Z., Liu, M., Chang, J., Wu, C., "Preparation of copper-containing bioactive glass/eggshell membrane nanocomposites for improving angiogenesis, antibacterial activity and wound healing", *Acta Biomaterialia*, Vol. 36, (2016), 254-266. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.011>
 29. Ye, J., He, J., Wang, C., Yao, K., Gou, Z., "Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity", *Biotechnology Letters*, Vol. 36, (2014), 961-968. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1465-x>
 30. Ma, J., Chen, C. Z., Wang, D. G., Jiao, Y., Shi, J. Z., "Effect of magnesia on the degradability and bioactivity of sol-gel derived SiO₂-CaO-MgO-P₂O₅ system glasses", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 81, (2010), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.022>
 31. Dietrich, E., Oudadesse, H., Lucas-Girot, A., Mami, M., "In vitro bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 88, (2009), 1087-1096. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31901>
 32. Watts, S., Hill, R. G., O'donnell, M. D., Law, R. V., "Influence of magnesia on the structure and properties of bioactive glasses", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 356, (2010), 517-524. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2009.04.074>
 33. Prabhu, M., Kavitha, K., Manivasakan, P., Rajendran, V., "Synthesis, characterization and biological response of magnesium-substituted nanobioactive glass particles for biomedical applications", *Ceramics International*, Vol. 39, No. 2, (2013), 1683-1694. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.08.011>
 34. Erol, M., Chen, C. Z., Wang, D. G., Hu, J. H., "Synthesis, characterization, and in vitro bioactivity of sol-gel-derived Zn, Mg, and Zn-Mg Co-doped bioactive glasses", *Chemical Engineering & Technology*, Vol. 33, (2010), 1066-1074. <https://doi.org/10.1002/ceat.200900495>
 35. Moya, J., Tomsia, A. P., Pazo, A., Santos, C., "In vitro formation of hydroxylapatite layer in a MgO-containing glass", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 5, (1994), 529-532. <https://doi.org/10.1007/BF00124885>
 36. Salinas, A., Roman, J., Vallet-Regi, M., Oliveira, J. M., "In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO P₂O₅-CaO SiO₂-CaO MgO 2SiO₂ system", *Biomaterials*, Vol. 21, (2000), 251-257. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00150-7)
 37. Saboori, A., Rabiee, M., Moztarzadeh, F., Sheikhi, M., Tahriri, M., Karimi, M., "Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO bioglass", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 29, (2009), 340-345. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.07.004>
 38. Wang, X., Li, X., Ito, A., Sogo, Y., "Synthesis and characterization of hierarchically macroporous and mesoporous CaO-MO-SiO₂-P₂O₅ (M= Mg, Zn, Sr) bioactive glass scaffolds", *Acta Biomaterialia*, Vol. 7, (2011), 3638-3644. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.029>
 39. Balamurugan, A., Balossier, G., Michel, J., Kannan, S., Benhayoune, H., Rebelo, A. H. S., Ferreira, J. M. F., "Sol gel derived SiO₂-CaO-MgO-P₂O₅ bioglass system—Preparation and

- into marginal gaps for composite restorations", *Dental Materials*, Vol. 32, (2016), 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.10.007>
60. Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., Mukherjia, S., "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles", *Acta Biomaterialia*, Vol. 4, (2008), 707-716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>
61. Robinson, D. A., Griffith, R. W., Shechtman, D., Evans, R. B., Conzemiua, M. G., "In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus", *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, (2010), 1869-1877. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.007>
62. Allan, I., Newman, H., Wilson, M., "Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra-and subgingival bacteria", *Biomaterials*, Vol. 22, (2001), 1683-1687. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00330-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00330-6)
- bioactive glass", *Bulletin of Materials Science*, Vol. 38, (2015), 957-964. <https://doi.org/10.1007/s12034-015-0936-6>
55. Zhang, K., Yan, H., Bell, D. C., Stein, A., Francis, L. F., "Effects of materials parameters on mineralization and degradation of sol-gel bioactive glasses with 3D-ordered macroporous structures", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 66, (2003), 860-869. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10093>
56. Hench, L. L., Wilson, J., An introduction to bioceramics, World scientific, (1993). <https://doi.org/10.1142/2028>
57. Jones, J. R., "New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure", *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 29, (2009), 1275-1281. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.003>
58. Chen, X., Ou, J., Wei, Y., Huang, Z., Kang, Y., Yin, G., "Effect of MgO contents on the mechanical properties and biological performances of bioceramics in the MgO-CaO-SiO₂ system", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 21, (2010), 1463-1471. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4025-5>
59. Khvostenko, D., Hilton, T. J., Ferracane, J. L., Mitchell, J. C., Kruzica, J. J., "Bioactive glass fillers reduce bacterial penetration